

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОТОПНЫХ ОТНОШЕНИЙ УГЛЕРОДА В СОСТАВЕ АМИНОКИСЛОТ ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

А. И. Соловьев¹, И. В. Подколзин²

¹ Химик, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: solovev_ai@arriah.ru

² Заведующий лабораторией, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: podkolzin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Проведена оценка возможности применения покомпонентного изотопного анализа (GC-C-IRMS) на примере 255 образцов мяса, собранных из 24 стран. По результатам определения изотопных отношений $\delta^{13}\text{C}$ в аминокислотах после газохроматографического разделения выполнена процедура классификации образцов методами опорных векторов и линейного дискриминантного анализа. Точность прогнозирования составила 65–75%. Несмотря на невысокую правильность идентификации при использовании только покомпонентного анализа, существует возможность существенно повысить надежность классификации в комбинации с другими данными за счет расширения размерности по числу переменных.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, идентификация, изотопные отношения, GC-C-IRMS.

ВВЕДЕНИЕ

Информация о происхождении продукта является весомым аргументом, который не в последнюю очередь влияет на решение вопроса о ввозе пищевой продукции из определенных государств. Важность инструмента, предоставляющего надежную и объективную информацию о происхождении продукции, трудно переоценить. С позиции экономики и безопасности, это дает возможность контроля соблюдения режима ограничений на ввоз продукции из стран с неблагоприятной экологической, санитарной и эпидемиологической ситуацией, в том числе из стран, попадающих под действие соответствующих экономических санкций. Так или иначе, знание региона происхождения служит гарантом качества и безопасности пищевой продукции и в конечном итоге влияет на цену и спрос.

В настоящее время разработаны различные аналитические методы, которые широко используются в контексте идентификации происхождения пищевой продукции. К ним относятся: изотопные отношения легких элементов, элементный анализ, ядерный магнитный резонанс, хроматографическое профилирование, методы инфракрасной спектроскопии средней и ближней областей [2, 7].

Несмотря на то что масс-спектрометрия изотопных отношений является самым мощным методом, предоставляющим обширную информацию о географическом происхождении объекта исследования [5, 13], все чаще появляются публикации о применении различных комбинаций перечисленных выше методов исследования. Метод **GC-C-IRMS** в настоящее время не

получил широкого распространения в лабораторной практике, в литературе описано несколько примеров его удачного применения при определении изотопных отношений углерода в составе жирных кислот [8]. Также данный подход был расширен для определения $\delta^{13}\text{C}$ [4], $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$ [3] и $\delta^{34}\text{S}$ [1].

Цель данной работы состояла в оценке возможности применения покомпонентного изотопного анализа производных аминокислот методом, основанным на газохроматографическом профилировании, с последующим определением изотопных отношений углерода, при установлении географического происхождения мяса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Средства измерений. Для определения изотопных отношений $\delta^{13}\text{C}$ летучих производных аминокислот использовали инструментальный комплекс (рис. 1), включающий газовый хроматограф Trace GC Ultra (Thermo Fisher, Германия) со встроенным в линию делителем потока на масс-спектрометр ISQ (Thermo Fisher, Германия) и масс-спектрометр изотопных отношений Delta V Advantage (Thermo Fisher, Германия) через подключенный интерфейс GC IsoLink (Thermo Fisher, Германия), оснащенный окислительным реактором.

Автоматическое разбавление газообразных продуктов, полученных в результате окисления разделенных производных аминокислот в окислительном реакторе, и подачу стандартных газов обеспечивали с помощью интерфейсного устройства ConFlo IV (Thermo Fisher, Германия).

Газы и реагенты: двуокись углерода жидкая с объемной долей основного вещества не менее 99,8% в газовом баллоне на 10 л; гелий газообразный марки 6.0 с объемной долей основного вещества не менее 99,9999% в газовом баллоне на 40 л; трифторуксусный ангидрид > 99% (Panreac), метанол > 99,9% (Sigma-Aldrich), дихлорметан > 99,9% (Sigma).

Получение производных аминокислот

Гидролиз. Навеску пробы 10 мг обезвоженного и обезжиренного гомогенизированного мяса вносили в виалу и добавляли 0,5 мл 6М HCl, после чего герметично закрывали фторопластовой крышкой и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 150 °C в течение 4 ч.

Далее отдували током азота при температуре 60 °C досуха.

Этерификация. В виалу, после гидролиза, к сухому остатку приливали 500 мкл 4М HCl в CH_3OH , после чего герметично закрывали фторопластовой крышкой и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 110 °C в течение 90 мин. Затем остатки растворителя отдували током азота при температуре 40 °C досуха.

Дериватизация. В виалу, после этерификации, добавляли 500 мкл CH_2Cl_2 и 40 мкл трифторуксусного ангидрида (TFAA), герметично закрывали фторопластовой крышкой и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 90 °C в течение 1 ч. Далее отдували током азота при комнатной температуре досуха, приливали 1 мл 10% раствора этилацетата в гексане, встряхивали и отбирали 200 мкл, разбавляли в 400 мкл гексана и хроматографировали.

Разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке DB-5 (Agilent, США) длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм). Условия разделения и детектирования представлены в таблице 1.

Программное обеспечение. Первичные результаты были обработаны с помощью пакета программного обеспечения ISODAT 3.0 (Termo Electron, Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием свободного программного обеспечения для статистических расчетов – R версии 3.1.2 с использованием следующих программных пакетов: caret 6.0-41 [10], e1071 1.6-4 [11], ggplot2 1.0.0 [15], kernlab 0.9-19 [6], lattice 0.20-29 [14], MASS 7.3-35 [9], pROC 1.7.3 [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пробы мяса были собраны в 2013–2014 гг. территориальными управлениями Россельхознадзора в пунктах прохождения ветеринарно-санитарного контроля для исследований по показателям качества и безопасности. Данная выборка представлена 255 образцами из 24 стран по 7 видам мяса (табл. 2). В силу неоднородности состава выборки и относительно небольшого количества образцов по отношению к охваченной территории, результаты исследования на данный момент не позволяют определять регион происхождения мяса с приемлемым уровнем доверительной вероятности,

Рис. 1. Схема инструментального комплекса для хроматографического разделения и определения изотопных отношений $\delta^{13}\text{C}$ производных аминокислот

Fig. 1. Platform diagram for chromatography-based separation and determination of isotopes ratio $\delta^{13}\text{C}$ of amino acid derivatives

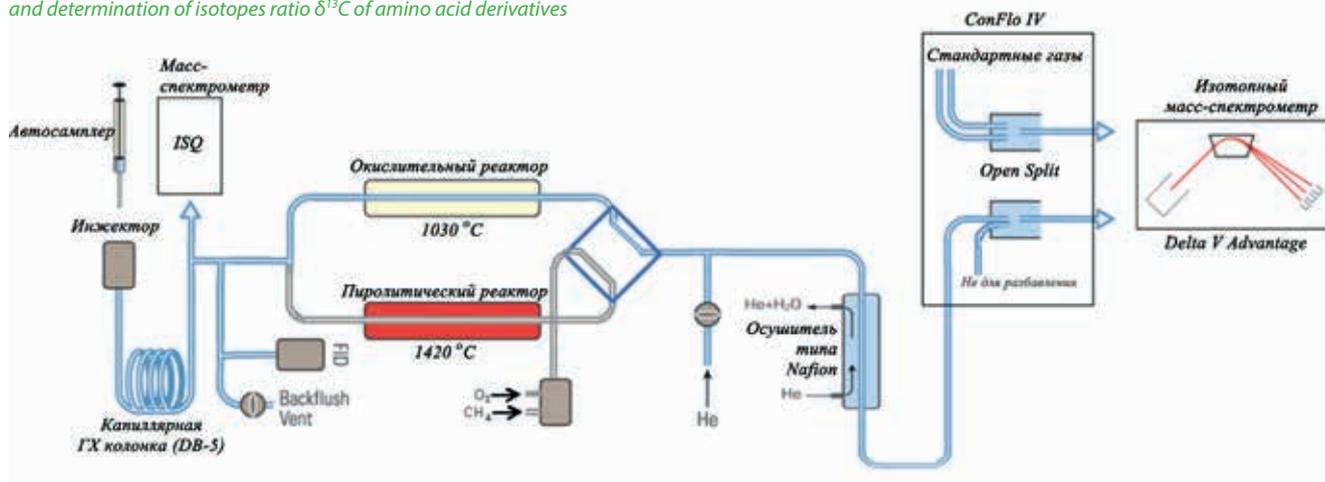


Таблица 1
Условия разделения и детектирования летучих производных аминокислот

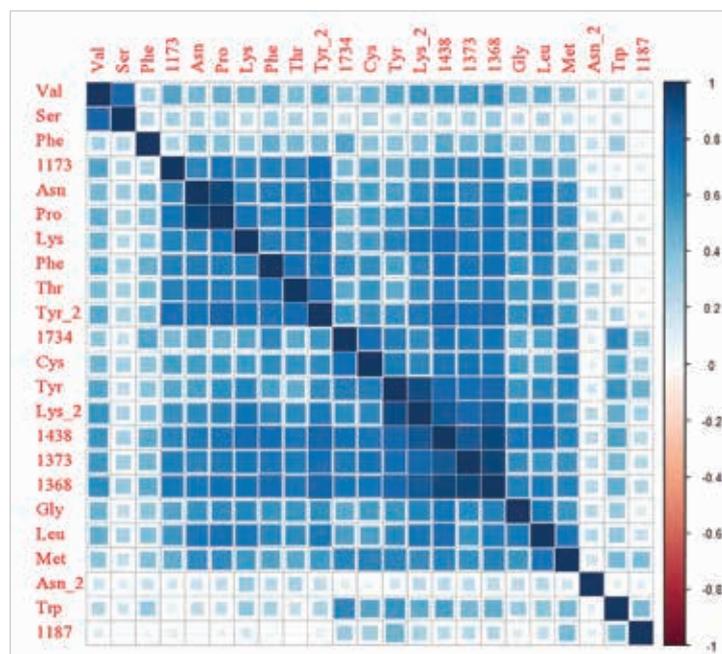
Параметр	ГХ-МС	IRMS
Вводимый объем	1 мкл	-
Способ ввода	без деления потока	-
Температура инжектора	230 °С	-
Температурный режим колонки	от 40 до 250 °С со скоростью 7,0 °С/мин, от 250 до 280 °С со скоростью 10,0 °С/мин	-
Скорость потока газа-носителя	1 мл/мин	-
Температура детектора	200 °С	-
Температура трансфер-линии	250 °С	-
Энергия ионизации	70 эВ	-
Температура окислительного реактора	-	1030 °С

но при этом являются достаточными для адекватной и состоятельной оценки применимости покомпонентного анализа аминокислот в решении задачи установления его географического происхождения.

Статистическая обработка. Изотопные отношения углерода в составе аминокислот определялись методом покомпонентного анализа – GC-C-IRMS. В отличие от классического подхода, где результатом определения $\delta^{13}C$ является усредненное значение по всем компонентам сложной матрицы, GC-C-IRMS позволяет установить величину $\delta^{13}C$ для конкретной молекулы вещества, тем самым учитывая более тонкие процес-

Рис. 2. Матрица корреляции $\delta^{13}C$ производных аминокислот 1173, 1187, 1368, 1373, 1438, 1734 – неидентифицированные компоненты.

Fig. 2. Correlation matrix of $\delta^{13}C$ amino acid derivatives 1173, 1187, 1368, 1373, 1438, 1734 – not identified components.



сы фракционирования, которые будут отличаться для разных видов организмов. Из хроматографического профиля разгонки гидролизата белковой части было выделено 23 компонента, соответствующие 13 аминокислотам: аспарагин (Asn), валин (Val), лейцин (Leu), глицин (Gly), лизин (Lys), метионин (Met), пролин (Pro), серин (Ser), тирозин (Tyr), треонин (Thr), триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), цистеин (Cys).

Ввиду тесной химической связи аминокислот, существует ярко выраженная корреляция между переменными (рис. 2). Для повышения устойчивости классификаторов к входным данным применяли процедуру трансформации и сжатия методом главных компонент (МГК). С целью выбора и сравнения линейных и нелинейных подходов классификации, в данной работе были использованы следующие алгоритмы: метод опорных векторов (SVM) с радиальными базисными функциями – в качестве функции ядра; линейный дискриминантный анализ (ЛДА) – в качестве наиболее распространенного линейного классификатора.

Точность прогнозирования для ЛДА и SVM составила 65–75%. Несмотря на то что правильность идентификации при использовании только покомпонентного анализа в решении задачи определения географического происхождения мяса остается невысокой, данный результат получен определением всего одного параметра ($\delta^{13}C$) в пространстве сильно коррелированных переменных (аминокислотных фракций). Таким образом, в комбинации с другими данными, покомпонентный анализ позволит существенно повысить надежность классификации за счет расширения размерности по числу переменных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на относительно небольшой объем выборки по отношению к охваченной территории, была показана перспективность применения покомпонентного анализа аминокислот с последующим определением изотопных отношений углерода в качестве дополнения к основным подходам в решении задач установления географического происхождения мясной продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amrani A., Sessions A. L., Adkins J. F. Compound-Specific $\delta^{34}S$ Analysis of Volatile Organics by Coupled GC/Multicollector-ICPMS // *Anal. Chem.* – 2009. – Vol. 81, № 21. – P. 9027–9034; doi:10.1021/ac9016538.
- Characterisation of milk by analysis of its terpene fractions / C. Fernandez, C. Astier, E. Rock [et al.] // *Int. J. Food Sci. Tech.* – 2003. – Vol. 38. – P. 445–451.
- High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry / J. T. Brenna, T. N. Corso, H. J. Tobias, R. J. Caimi // *Mass Spectrom. Rev.* – 1988. – Vol. 16, № 5. – P. 227–258.
- Hofmann D., Gehre M., Jung K. Sample preparation techniques for the determination of natural $^{15}N/^{14}N$ variations in amino acids by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) // *Isot. Environ. Health. S.* – 2003. – Vol. 39, № 3. – P. 233–244.
- Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis // *Trends Food Sci. Tech.* – 2005. – Vol. 16, № 12. – P. 555–567.
- Package for Kernel Methods in {R} / A. Karatzoglou, A. Smola, K. Hornik, A. Zeileis // *J. Stat. Softw.* – 2004. – Vol. 11, № 9; doi:10.18637/jss.v011.i09.

Таблица 2
Состав выборки исследуемых образцов

Страна	Код*	Вид мяса							Кол-во проб по странам
		Свинина	Говядина	Курица	Гусь	Индейка	Конина	Баранина	
Аргентина	ARG	0	0	0	0	0	5	0	5
Австрия	AUT	5	2	0	0	0	0	0	7
Бельгия	BEL	5	0	0	0	0	0	0	5
Беларусь	BLR	13	1	0	0	0	0	0	14
Бразилия	BRA	9	34	8	0	1	0	0	52
Канада	CAN	2	0	0	0	0	0	0	2
Дания	DNK	6	4	0	0	0	0	0	10
Испания	ESP	1	6	0	0	0	0	0	7
Финляндия	FIN	0	0	3	0	0	0	0	3
Франция	FRA	4	0	0	0	0	0	0	4
Германия	DEU	11	0	0	0	0	0	0	11
Венгрия	HUN	0	0	0	2	0	0	1	3
Италия	ITA	0	1	0	0	0	0	0	1
Литва	LTU	0	7	0	0	0	0	0	7
Молдова	MDA	0	0	0	0	0	1	1	2
Мексика	MEX	0	4	0	0	0	0	0	4
Нидерланды	NLD	1	0	0	0	0	0	0	1
Новая Зеландия	NZL	0	0	0	0	0	0	4	4
Польша	POL	0	6	0	0	0	0	0	6
Парагвай	PRY	0	1	0	0	0	0	0	1
Россия	RUS	0	11	6	0	0	0	18	35
Украина	UKR	7	46	3	0	0	0	0	56
Уругвай	URY	0	1	0	0	0	0	1	2
США	USA	0	6	7	0	0	0	0	13
Кол-во проб по виду мяса		64	130	27	2	1	6	25	255

* Согласно стандарту ISO 3166-1.

7. Luyckx D. M. A. M., van Ruth S. M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products // Food Chem. – 2008. – Vol. 107, № 2. – P. 897–911.

8. Meier-Augenstein W. Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry // Anal. Chim. Acta. – 2002. – Vol. 465, № 1–2. – P. 63–79.

9. Modern Applied Statistics with S / ed. W. N. Venables, B. D. Ripley. – 4th ed. – New York: Springer, 2002. – URL: <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4>.

10. Package 'caret': Classification and Regression Training / M. Kuhn [et al.]. – 2016. – URL: <http://cran.r-project.org/package=caret>.

11. Package 'e1071': Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien / D. Meyer [et al.]. – 2017. – URL: <https://CRAN.R-project.org/package=e1071>.

12. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves / X. Robin [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2011. – Vol. 12:77; doi:10.1186/1471-2105-12-77.

13. Relationships between flavoring capabilities, bacterial composition, and geographical origin of natural whey cultures used for traditional waterbuffalo mozzarella cheese manufacture / G. Mauriello, L. Moio, A. Genovese, D. Ercolini // J. Dairy Sci. – 2003. – Vol. 86. – P. 486–497.

14. Sarkar D. Lattice: Multivariate Data Visualization with R. – New York: Springer, 2008. – 273 p. – URL: <http://lmdvr.r-forge.r-project.org>.

15. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis (Use R!). – New York: Springer, 2009. – URL: <http://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>.